

线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-S005-48 紫外分光法 48 样)

一、产品简介:

线粒体异柠檬酸脱氢酶即 NAD-异柠檬酸脱氢酶 (NAD-IDH EC 1.1.1.41) 广泛存在于动物、植物和培养细胞的线粒体中, 在三羧酸循环中催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 同时将 NAD^+ 还原为 NADH, 是三羧酸循环的限速酶之一, 其催化的反应是细胞 NADH 主要来源之一。

NAD-异柠檬酸脱氢酶催化 NAD^+ 还原生成 NADH, 导致 340nm 处光吸收上升, 进而得出 NAD-IDH 酶活性的大小。

二、试剂盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|---------|-----------------------------------|
| 试剂一 | 液体 60mL×1 瓶 | -20°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 10mL×1 瓶 | -20°C保存 | |
| 试剂三 | 液体 1 支 | -20°C保存 | |
| 试剂四 | 液体 25mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂五 | 粉剂 1 瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 5mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂六 | 粉剂 1 瓶 | 4°C保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 7mL 蒸馏水溶解备用。 |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4°C×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×12000g 离心 10min。用移液器移除上清液(上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的酶活性 (此步可选做)), 留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200 μL 试剂二和 2 μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体 NAD-异柠檬酸脱氢酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 设定温度 37°C, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- ③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|------------------------|-----|
| 样本 | 60 |

| | |
|---|-----|
| 试剂四 | 500 |
| 试剂五 | 80 |
| 试剂六 | 100 |
| 混匀，37°C条件下，30s 时于 340nm 处读取 A1 值，30min 后读取 A2 值， $\Delta A=A2-A1$ 。 | |

【注】：若 ΔA 在零附近，可以延长反应时间 T（如：60min 或更长），或增加样本量 V1（如 100 μ L，则试剂四相应减少）。调整后的反应时间 T 或样本体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 66.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 13.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4)=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.03 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

d---光径，1cm;

V---加入提取液体积，0.202mL;

V1---加入样本体积，0.06mL;

V2---反应体系总体积， $7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$;

W---样本质量，g;

500---细菌或细胞总数，万;

T---反应时间，30 min;

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。